动 物 学 研 究 2005, Jun. 26 (3): 237-242
Zoological Research
CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853

鲫鱼蛋白激酶 PKR-like 的 Zα 结构域与聚肌胞苷酸的结合

胡成钰[1,2,3]，谢宗波[3]，张义兵[1]，陈玉栋[1]，邓政东[3]，蒋 珺[1]，桂建芳[1,*]
（1. 中国科学院水生生物研究所，淡水生态与生物技术国家重点实验室，湖北 武汉 430072；
2. 中国科学院研究生院，北京 100039；3. 南昌大学 生命科学学院，南昌 330047）

摘要：根据鲫鱼类 PKR 蛋白激酶基因（CaPKR-like）的全长 cDNA 序列，克隆 CaPKR-like Zα 结构域 cDNA（Zα1、Zα2 和 Zα1 Zα2），原核表达成功获得 3 种融合蛋白 $P_{Z\alpha1}$、$P_{Z\alpha2}$和 $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$。凝胶阻滞实验结果显示：$P_{Z\alpha1}$、$P_{Z\alpha2}$、$P_{Z\alpha1}$和 $P_{Z\alpha2}$混合表达蛋白不能与聚肌胞苷酸（Poly I:C）结合，而表达完整的 Zα 结构域的 $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$与 Poly I:C 有明显的结合现象。另外，3 种表达多肽 $P_{Z\alpha1}$、$P_{Z\alpha2}$和 $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$在体外分别都能聚合形成二聚体。与 $P_{Z\alpha1}$相比，$P_{Z\alpha2}$和 $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$二聚化现象显著。结果暗示病毒复制时产生的副产物 dsRNA 能与 CaPKR-like 蛋白的相关结构域结合从而调节其生理功能。

关键词：鲫鱼类 PKR 蛋白激酶；Zα 结构域；原核表达；Poly I:C 结合；二聚化
中图分类号：Q959.468；S941 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853（2005）03-0237-06

Binding of the Zα Domain from a *Carassius auratus* Protein Kinase PKR-like to Polyinosinic:Polycytidylic Acid

HU Cheng-yu[1,2,3], XIE Zong-bo[3], ZHANG Yi-bing[1], CHEN Yu-dong[1], DENG Zheng-dong[3], JIANG Jun[1], GUI Jian-fang[1,*]
(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: Three fusion peptides, $P_{Z\alpha1}$, $P_{Z\alpha2}$ and $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$ for Zα1 domain, Zα2 domain, and Zα1Zα2 domains of *Carassius auratus* PKR-like gene, respectively, were successfully expressed by a prokaryotic expression system and then purified by affinity chromatography. Gel mobility shift assay revealed that $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$ rather than $P_{Z\alpha1}$, $P_{Z\alpha2}$, and mixture of $P_{Z\alpha1}$ and $P_{Z\alpha2}$, was capable to bind to polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C) *in vitro*. In addition, all of the three fusion peptides all could form dimer, with strong dimerization for $P_{Z\alpha2}$ and $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$ but a relative weak one for $P_{Z\alpha1}$. The results suggest that dsRNA, the by-product generated during virus replication in host cells, probably binds to the Zα domain of CaPKR-like and then regulates its physiological function.

Key words: CaPKR-like protein kinase; Zα domain; Prokaryotic expression; Poly I:C binding; Dimerization

高度保守的 Zαβ（Z-DNA 结合域）结构首先在 ADAR1 中得到鉴定（Schwartz et al, 1999; Bass, 1997; Herbert et al, 1995, 1997; Patterson et al, 1995）。ADAR1 为双链 RNA 腺苷脱氨酶，是由干扰素诱导的一种 RNA 编辑酶（Bass, 1997; Herbert et al, 1997; Patterson et al, 1995），能将 RNA 中的腺嘌呤转变为次黄嘌呤（Liu & Samuel, 1996; Patterson & Samuel, 1995）。人 ADAR1 的 N-端有两个构象高度保守的 Z-DNA 结合域，Zα 和 Zβ，各由 70 多个氨基酸残基组成。此外在肿瘤蛋白 DLM1

收稿日期：2004-12-16；接受日期：2005-02-24
基金项目：国家重点基础研究发展规划（973）项目（2004CB117403）；国家高技术研究发展计划（863）项目（2002AA626010）；国家自然科学基金资助项目（30200207，30471333）；江西省教育厅项目（0405）资助
* 通讯作者（Corresponding author）：桂建芳，研究员，Tel：027-68780707，E-mail：jfgui@ihb.ac.cn.
第一作者简介：胡成钰（1964-），男，江西南昌人，在职博士研究生，从事细胞生物学研究。

及痘苗病毒、天花病毒、口疮病毒、皱皮病毒、猪痘病毒、瘤痘病毒和牛痘病毒等病毒的E3L蛋白也发现有Zαβ结构域（Kim et al，2003）。Schade et al（1999a，b）利用多维核磁共振发现Zα的拓扑学结构为α1β1α2α3β2β3，其中β1和β3能相互作用。点诱变显示α3、β3以及β2、β3会影响Zαβ与Z-DNA结合。

ADAR1 Zαβ对超负螺旋的左旋DNA（Z-DNA）有高度的亲和性（Herbert et al，1998）。由于Z-DNA是一种处于高能状态的不稳定DNA，其构象要靠Zαβ-Z-DNA复合物来维持；所以，在一般情况下，未形成复合物的Z-DNA很容易转变为B-DNA（右旋DNA）（Schade et al，1999a，b；Herbert et al，1998)。Herbert et al（1998）发现Z-DNA与Zαβ结合的位点为很短的特定序列，不超过6 bp，同时认为Zαβ与DNA结合是构象依赖性而非序列依赖性。

PKR是双链RNA激活的、干扰素诱导的丝氨酸蛋白激酶［double stranded（ds）RNA activated，interferon induced protein kinase］，它作为干扰素系统中重要的效应子而受到广泛的研究。哺乳类PKR蛋白的N－端为两个dsRBMs域（dsRBM1和dsRBM2），并能够高效结合dsRNA（Green & Mthew，1992；McCormack et al，1992；Thomis & Samuel，1993；Clemens & Elia，1997）。鲫鱼类PKR基因（*Carassius auratus* CaPKR-like）是从鲫鱼中克隆的、与哺乳类PKR高度同源的基因，编码一个由513个氨基酸组成的蛋白。虽然其C－端具有PKR家族高度保守的功能结构域，但N－端没有典型的dsRBM，取代的是两个Z-DNA结合域（Zα1和Zα2）（Hu et al，2004）。聚肌胞苷酸（polyinosinic∶polycytidylic acid，Poly I∶C）是人工合成的dsRNA，能有效激活干扰素系统基因包括PKR基因的表达（Zhang et al，2003，2004；Zhang & Gui，2004）。为了进一步了解CaPKR-like是否具有与哺乳类PKR相同的功能，本文通过原核表达CaPKR-like包含Zα的结构域，发现表达多肽与哺乳类PKR dsRBM一样，在体外能有效结合Poly I∶C。

1 材料和方法

1.1 CaPKR-like Zα结构域的克隆

根据CaPKR-like基因的cDNA序列设计了2对引物：F1（5-ATCGGATCCATGGAGAGGAAGATCATTGAT-3，含*Bam*HⅠ酶切位点），R1（5-GCTCGAGTCACTTCTCCATTAGATCCCA-3，含*Xho*Ⅰ酶切位点)；F2(5-ATCGGATCCATGTCTCTGACGACGACAG-3，含*Bam*HⅠ酶切位点)，R2（5-GCTCGAGTCACTCGCCTTCCAGAAGC-3，含*Xho*Ⅰ酶切位点)。利用Advantage cDNA Polymerase Mix（Clontech)，以引物F1＋R1组合从灭活GCHV诱导的SMART-cDNA文库中得到包含Zα1结构域的cDNA（CaPKR-like蛋白的第8—65氨基酸）；F2＋R2引物扩增包含Zα2结构域的cDNA（第80—145氨基酸）；F1＋R2引物扩增包括Zα1＋Zα2结构域的cDNA（第8—145氨基酸）。将上述3种目的cDNA片段通过引物上的酶切位点定向插入原核表达载体pET32a（Novagen），测序分析插入片段序列的正确性，然后转化到大肠杆菌DE3中经IPTG诱导表达。

1.2 CaPKR-like Zα多肽的表达和纯化

转化表达质粒的DE3接入5 mL含Amp的LB培养基中，37 ℃振荡培养过夜，而后接种于500 mL含Amp的LB培养基中，37 ℃振荡培养，当检测菌液OD_{600}为0.6～0.8时，加入IPTG（作用浓度为1 mmol/L）诱导，37 ℃继续培养4～6 h。

取诱导菌液离心（4 ℃，10 000 *g*）10 min，菌体沉淀用25 mL 1×Binding buffer（组成见His-Bind Kit操作手册，Novagen）重悬，超声波破碎，离心（4 ℃，14 000 *g*）20 min，取上清通过His-Bind树脂亲和层析的方法纯化目的多肽（具体操作见His-Bind Kit操作手册，Novagen）。纯化多肽在缓冲液（20%甘油，150 mmol/L NaCl，1 mmol/L DTT，0.5 mmol/L EDTA，20 mmol/L HEPES，pH 7.5）中透析过夜，－80 ℃保存备用。

1.3 凝胶阻滞实验

在10 μL体系中，3种纯化多肽$P_{Z\alpha1}$、$P_{Z\alpha2}$和$P_{Z\alpha1Z\alpha2}$分别与Poly I∶C混合，表达多肽和Poly I∶C的终浓度均为0.2 μg/μL。然后置冰上30 min，1%琼脂糖凝胶电泳检测。设置不加表达多肽的Poly I∶C作对照。如果表达多肽与Poly I∶C发生结合，则在电泳中Poly I∶C迁移率下降，相应的条带发生滞后。

1.4 CaPKR-like Zα表达蛋白的聚合分析

在10 μL体系中，将3种纯化多肽$P_{Z\alpha1}$、$P_{Z\alpha2}$和$P_{Z\alpha1Z\alpha2}$（终浓度为0.6 μg/μL）分别直接、或与Poly I∶C（终浓度为0.4 μg/μL）混匀，置冰上1 h后加入缓冲液（0.25%溴芬蓝，40%蔗糖的水溶液）进

行 12%SDS-PAGE 电泳，考马斯亮蓝染色观察表达多肽的聚合。设置直接置冰上 1 h、然后加入 2% SDS 煮沸 3 min 的 3 种纯化表达多肽作为对照。

2 结　果

2.1 CaPKR-like 基因 Zα 结构域的原核表达及蛋白纯化

根据已经获得的 CaPKR-like 基因的 cDNA 序列，利用 PCR 方法分别得到包含第一个 Zα 结构域的 cDNA 片段（Zα1 cDNA，编码 CaPKR-like 蛋白的第 8—65 氨基酸），包含第二个 Zα 结构域的 cDNA 片段（Zα2 cDNA，编码第 80—145 氨基酸），以及包含两个 Zα 结构域的 cDNA 片段（Zα1Zα2 cDNA，编码第 8—145 氨基酸），连接到原核表达载体 pET32a，PCR 检测和序列分析证实与预期的 Zα1、Zα2 和 Zα1Zα2 序列一致。分别取 3 种转化成功的 DE3 菌液经 IPTG 诱导表达获得预期大小的融合蛋白 $P_{Z\alpha1}$、$P_{Z\alpha2}$和 $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$（图 1）。因为融合蛋白带有 His 标签，因此采用 His-Bind 树脂进行亲和纯化后，得到了 3 种纯化的融合蛋白（图 2）。

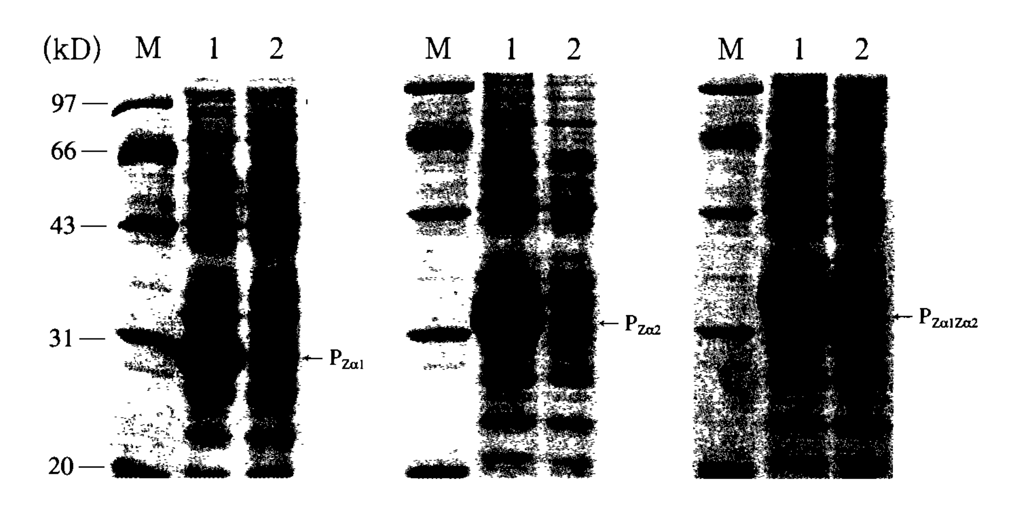


图 1　CaPKR-like 基因 Zα 结构域的原核表达

Fig. 1　Prokaryotic expression of CaPKR-like Zα domains

M：标准蛋白；1：经诱导表达获得的含有融合蛋白 $P_{Z\alpha1}$、$P_{Z\alpha2}$和 $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$ 的全部细菌蛋白；2：未经诱导表达的全部细菌蛋白。

Total proteins of the non-induced host strain (2) and the induced host strain transformed with $P_{Z\alpha1}$, $P_{Z\alpha2}$ and $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$ (1) were separated on 12% SDS-PAGE. M: Protein molecular weight marker.

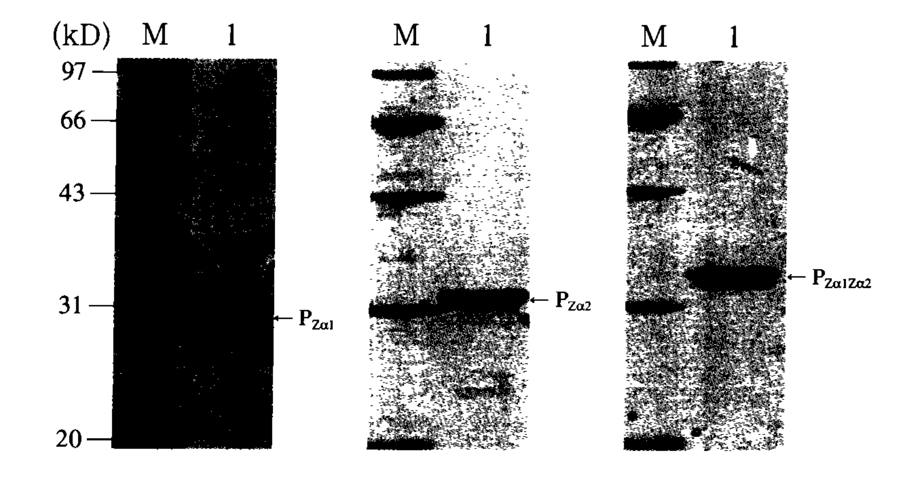


图 2　CaPKR-like Zα 融合蛋白的亲和层析纯化

Fig. 2　Purification of three kinds of CaPKR-like Zα fusion proteins by affinity chromatography

M：标准蛋白；1：纯化的融合蛋白 $P_{Z\alpha1}$、$P_{Z\alpha2}$和 $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$。

1: Purified $P_{Z\alpha1}$, $P_{Z\alpha2}$ and $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$; M: Protein molecular weight marker.

2.2 CaPKR-like 基因 Zα 表达多肽与 Poly I:C 的结合

结果如图 3，将 $P_{Z\alpha1}$和 $P_{Z\alpha2}$，以及 $P_{Z\alpha1}$和 $P_{Z\alpha2}$混合多肽分别与 Poly I:C 作用后，琼脂糖凝胶电泳检测 Poly I:C 不发生阻滞作用，但 Poly I:C 与 $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$作用后产生明显的阻滞（图 3 箭头显示）。这表明包含 Zα1 和 Zα2 结构域的表达多肽能有效结合 Poly I:C，但是 $P_{Z\alpha1}$和 $P_{Z\alpha2}$以及它们的混合多肽都不能结合 Poly I:C。结果同时表明，虽然表达的 $P_{Z\alpha1}$、$P_{Z\alpha2}$和 $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$都是融合蛋白（包含有组氨酸标签），但融合蛋白中的组氨酸标签不能、也不影响与Poly I:C 的结合。

进一步检测了 $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$浓度对结合 Poly I:C 能力的影响。结果如图4，在10 μL体系中，当Poly I:C 浓度一定（0.1 μg/μL）时，随着 $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$浓度的增加，琼脂糖凝胶电泳检测 Poly I:C 的阻滞作用越明显。

2.3 CaPKR-like 基因 Zα 表达多肽的聚合

3 种表达多肽 $P_{Z\alpha1}$、$P_{Z\alpha2}$、$P_{Z\alpha1Z\alpha2}$置冰上 1 h 后分子间能聚合形成二聚体（图 5）。三者比较而言，$P_{Z\alpha1}$只有微弱的聚合反应，而 $P_{Z\alpha2}$和 $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$聚合反应明显。另外，结果显示 Zα 表达多肽的聚合与是否存在 Poly I:C 无关，而加入 SDS 并煮沸 3 min 会破坏聚合作用。

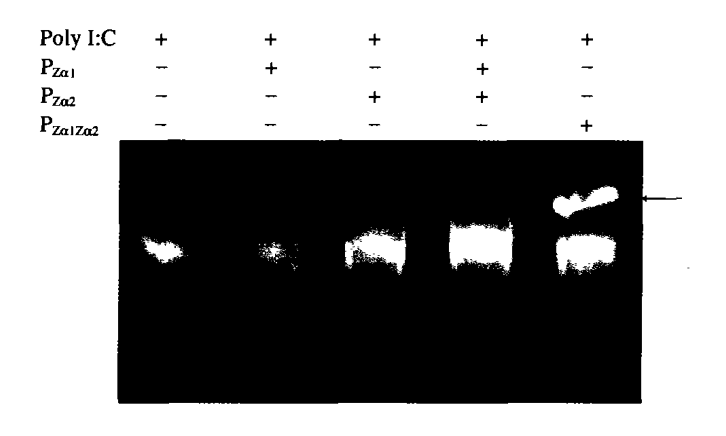


图 3 CaPKR-like Zα 多肽与 Poly I:C 的凝胶阻滞分析

Fig. 3 Gel mobility shift assay for the binding of CaPKR-like Zα fusion proteins to Poly I:C

在 3 种 CaPKR-like Zα 表达多肽中，只有 $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$能结合 Poly I:C。箭头示 Poly I:C 阻滞带。

Among the three expressed peptides of CaPKR-like Zα, only $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$ can bind to Poly I:C. The retarded band of Poly I:C is indicated by the arrow.

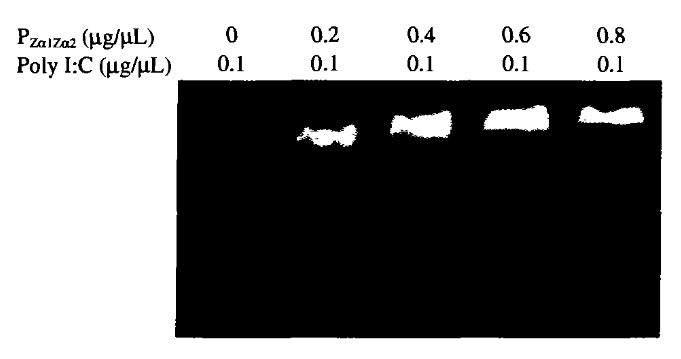


图 4 $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$浓度对结合 Poly I:C 的影响

Fig. 4 Influence of $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$ concentration on its binding to Poly I:C

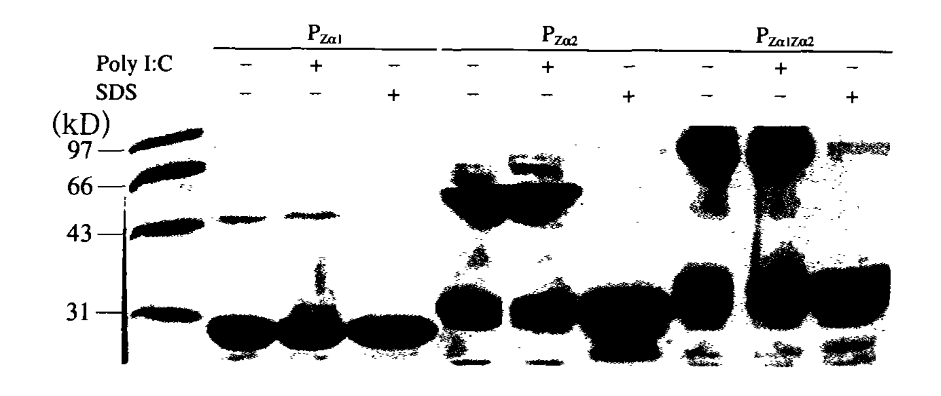


图 5 CaPKR-like Zα 多肽的体外二聚化

Fig. 5 *In vitro* dimerization of CaPKR-like Zα fusion proteins

3 讨 论

目前关于 Zαβ 结构域功能的认识主要源于对人 ADAR1 的相关研究（Schwartz et al，1999；Bass，1997；Herbert et al，1995，1997，1998；Patterson et al，1995；Liu & Samuel，1996；Patterson & Samuel，1995；Kim et al，2000，2003；Schade et al，1999a，b；Brown et al，2000）。虽然对 Zαβ 结构域的命名最初是因为发现其能特异结合 Z-DNA，但后来的证据显示体外表达的 Zαβ 多肽也能通过某种机制与 B-DNA 或 Z-RNA 结合（Brown et al，2000；Schade et al，1999b；Kim et al，2000）。然而迄今对 ADAR1 Zαβ 准确的生物学功能仍不十分清楚。Herbert et al（1998）认为 Zαβ 结构域对 ADAR1 编辑新转录 RNA 起调节作用。例如，RNA 聚合酶Ⅲ在发挥转录活性时能导致邻近的 DNA 序列形成负超螺旋（Z-DNA）结构，这时 Zαβ 可能会引导 ADAR1 与 Z-DNA 结合、定时定量地编辑 RNA，从而调节 RNA 聚合酶Ⅲ的转录活性。序列分析表明，CaPKR-like 蛋白的 N－端调节区也有 Z-DNA 结合域（Zα1 对应于 ADAR1 Zα、Zα2 对应于 ADAR1 Zβ）（Hu et al，2004）。由于 CaPKR-like 是第一个报道的具有 Zα 结构域的 PKR 同源物，同时该基因能被 Poly I:C、病毒感染和干扰素诱导表达（Hu et al，2004；Zhang et al，2003，2004；Zhang & Gui，2004）。因此我们推测 CaPKR-like Zα 应该具有 ADAR Zαβ 结构域的相关功能，但也可能具有与 PKR dsRBM 相类似的功能活性，如能与 dsRNA 结合、形成二聚体等。

凝胶阻滞实验是一种常用的定性分析核酸与蛋白结合的方法。其原理是核酸与蛋白结合后而导致核酸迁移率下降，在琼脂糖电泳时相应电泳带发生滞后，因此很容易鉴定核酸与蛋白是否发生结合。本研究发现包含 Zα1 和 Zα2 两个结构域的表达多肽 $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$与 Poly I:C 有明显的结合作用，但 $P_{Z\alpha1}$、$P_{Z\alpha2}$以及 $P_{Z\alpha1}$和 $P_{Z\alpha2}$进行混合后都不与 Poly I:C 结合（图 3），表明一个完整的 Zαβ（包括 Zα 和 Zβ 之间的连接氨基酸）可能更有利于与 Poly I:C 的结合，而且这种结合可能并非两个结构域的相互作用，这一特性和人 ADAR1 Zαβ 与 Z-DNA 结合相似。同样利用凝胶阻滞分析的方法，Schwartz et al（1999）发现，虽然组成人 ADAR1 的 Zα 和 Zβ 序列具有很高同源性，但 Zα 能与 Z-DNA 结合而 Zβ 却不能，同时完整的 Zαβ 与 Z-DNA 的亲和力要比 Zα 的高 5 倍。

病毒或 Poly I:C 感染哺乳类细胞时，本底表达但没有活性的 PKR 的 dsRBM 将结合 dsRNA，引起 PKR 分子间的 dsRBM2 相互作用，导致 PKR 分子二聚化或多聚化，从而激活 PKR（Clemens & Elia，1997；Tian & Mathews，2001）。本研究结果表明，$P_{Z\alpha1}$、$P_{Z\alpha2}$和 $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$都能二聚化，虽然 $P_{Z\alpha1}$的二聚化能力较弱（图 5）。另外，实验中没有发现多聚化现象。在哺乳类，PKR 的二聚化主要是由于 dsRBM2-dsRBM2 的相互作用，而 dsRBM1-dsRBM1 的结合很微弱（Clemens & Elia，1997；Tian & Mathews，2001），最近的研究还证实超过一定浓度的 PKR 二聚化、自我磷酸化、激活可以不需要 dsRNA 的结合刺激（Lemaire et al，2005）。本实验结果初步表明 Poly I:C 对 CaPKR-like 的 $P_{Z\alpha1}$、$P_{Z\alpha2}$和 $P_{Z\alpha1Z\alpha2}$形成二聚体没有促进作用（图 5）。

CaPKR-like 蛋白同时具有哺乳类干扰素系统中两种重要的效应蛋白 ADAR1 和 PKR 的结构特征。虽然现在还不清楚是否其他鱼类也具有与 CaPKR-like 类似的 PKR 基因，或者是否由于鱼类低等的进化地位以及与哺乳类面临不同的进化压力导致不同鱼类的 PKR 基因有非常大的变异，但是前期的工作表明，CaPKR-like 基因具有与哺乳类 PKR 相同的诱导表达特性（Hu et al，2004；Zhang et al，2003，2004；Zhang & Gui，2004）。本研究的初步结果表明 CaPKR-like 的 Zα 结构域在体外能够结合 dsRNA（Poly I:C），而且能够二聚化。由于在病毒感染的细胞中会产生 dsRNA 副产物，因此意味着 CaPKR-like 蛋白在病毒感染的细胞中很可能也能结合 dsRNA，并形成二聚体，行使类似哺乳类 PKR 的各种生理功能。但是阐明 Zα 结构域在 CaPKR-like 功能中的重要作用还必须有更多的实验证据。

参考文献：

Bass BL. 1997. RNA editing and hypermutation by adenosine deamination [J]. *Trends Biochem. Sci.*, **22**: 157－162.

Brown Ⅱ BA, Lowenhaupt K, Wilbert CM, Hanlon EB, Rich A. 2000. The Zα domain of the editing enzyme dsRNA adenosine deaminase

binds left-handed Z-RNA as well as Z-DNA [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 13532-13536.

Clemens MJ, Elia A. 1997. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: Structure and function [J]. *J. Interferon Cytokine Res.*, **17**: 503-524.

Green SR, Mthew MB. 1992. Two RNA binding motifs in the double-stranded RNA activated protein, DAL [J]. *Genes Rev.*, **6**: 2478-2490.

Herbert A, Lowenhaupt K, Spitzer J, Rich A. 1995. Chicken double-stranded RNA adenosine deaminase has apparent specificity for Zα [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 7550-7554.

Herbert A, Alfken J, Kim YG, Mian IS, Nimkura K, Rich A. 1997. A Z-DNA binding domain present in the human editing enzyme, double-stranded RNA adenosine deaminase [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 8421-8426.

Herbert A, Schade M, Lowenhaupt KY, Alfken J, Schwartz T, Shiyakhtenko LS, Lyubchenko YL, Rich A. 1998. The Zα domain from human ADAR1 binds to the Z-DNA conformer of many different sequences [J]. *Nucleic Acids Res.*, **26**: 3486-3493.

Hu CY, Zhang YB, Huang GP, Zhang QY, Gui JF. 2004. Molecular cloning and characterisation of a fish PKR-like gene from cultured CAB cells induced by UV-inactivated virus [J]. *Fish & Shellfish Immunol.*, **17**: 353-366.

Kim YG, Lowenhaupt KY, Maas S, Herbert A, Schwartz T, Rich A. 2000. The Zα domain of the human RNA editing enzyme ADAR1 recognizes Z-DNA when surrounded by B-DNA [J]. *J. Biol. Chem.*, **275**: 26828-26833.

Kim YG, Muralinath M, Brandt T, Pearcy M, Hanus K, Lowenhaupt KY, Jacobs BL, Rich A. 2003. A role for Z-DNA binding in vaccinia virus pathogenesis [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**: 6974-6979.

Lemaire PA, Lary J, Cole JL. 2005. Mechanism of PKR activation: Dimerization and kinase activation in the absence of double-stranded RNA [J]. *J. Mol. Biol.*, **345** (1): 81-90.

Liu Y, Samuel CE. 1996. Mechanism of interferon action: Functionally distinct RNA-binding and catalytic domains in interferon-inducible, double-stranded RNA-specific adenosine deaminase [J]. *J. Virol.*, **70**: 1961-1968.

McCormack SJ, Thomis DC, Samuel CE. 1992. Mechanism of interferon action: Identification of a RNA binding domain within the N-terminal region of the human RNA-dependent P1/eIF-2α protein kinase [J]. *Virology*, **188**: 47-56.

Patterson JB, Samuel CE. 1995. Expression and regulation by interferon of a double-stranded RNA-specific adenosine deaminase from human cells: Evidence for two forms of the deaminase [J]. *Mol. Cell Biol.*, **15**: 5376-5388.

Patterson JB, Thomis DC, Hans SL, Hans SL, Samuel CE. 1995. Mechanism of interferon action: Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase from human cells is inducible by alpha and gamma interferons [J]. *Virology*, **210**: 508-511.

Schade M, Turner CJ, Lowenhaupt KY, Rich A, Herbert A. 1999a. Structure-function analysis of the Z-DNA-binding domain Zα of dsRNA adenosine deaminase type 1 reveals similarity to the (α+β) family of helix-turn-helix protein [J]. *EMBO J.*, **18**: 470-479.

Schade M, Turner CJ, Kühne R, Schmieder P, Lowenhaupt KY, Herbert A, Rich A, Oschkinat H. 1999b. The solution structure of the Zα domain of the human RNA editing enzyme ADAR1 reveals a prepositioned binding surface for Z-DNA [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 12465-12470.

Schwartz T, Lowenhaupt K, Kim YG, LI L, Brown Ⅱ BA, Herbert A, Rich A. 1999. Proteolytic dissection of Zab, the Z-DNA-binding domain of human ADAR1 [J]. *J. Biol. Chem.*, **274**: 2899-2906.

Thomis DC, Samuel CE. 1993. Mechanism of interferon action: Evidence for intermolecular autophosphorylation and autoactivation of the interferon-induced, RNA-dependent protein kinase [J]. *J. Virol.*, **67**: 7695-7700.

Tian B, Mathews MB. 2001. Functional characterization of and cooperation between the double-stranded RNA-binding motifs of the protein kinase PKR [J]. *J. Biol. Chem.*, **276**: 9936-9944.

Zhang YB, Gui JF. 2004. Cloning, identification and characterization of interferon system genes in crucian carp (*Carassius auratus* L.) [J]. *Journal of the Graduate School of the Chinese Academy of Sciences*, **21** (3): 418-425.

Zhang YB, Zhang QY, Xu DQ, Hu CY, Gui JF. 2003. Identification of antiviral-relevant genes in the cultured fish cells induced by UV-inactivated virus [J]. *Chin. Sci. Bull.*, **48** (6): 581-588. [张义兵，张奇亚，徐德全，胡成钰，桂建芳. 2003. 从灭活病毒诱导的培养细胞中鉴定鱼类抗病毒相关基因. 科学通报，**48** (5): 457-463.]

Zhang YB, Zhang QY, Gui JF. 2004. Interferon system and identification of interferon system genes in fish [J]. *Acta Hydrobiologica Sin.*, **28**: 317-322. [张义兵，张奇亚，桂建芳. 2004. 鱼类的干扰素系统和干扰素系统基因的鉴定. 水生生物学报，**28**: 317-322.]